

鸡传染性贫血病毒 VP2 基因的表达及其免疫活性分析

王晓艳¹, 王笑梅^{1*}, 高玉龙¹, 高宏雷¹, 陆桂丽²

(¹ 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室 禽传染病研究室 哈尔滨 150001)

(² 新疆农业大学 乌鲁木齐 830052)

摘要 利用特异性引物从组织病料中提取的鸡传染性贫血病毒核酸经 PCR 扩增得到 VP2 基因, *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切处理, 纯化后, 克隆至 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切处理的表达载体 pET-28a 中, 构建了原核表达质粒 pET-28-VP2。将 pET-28-VP2 转化至感受态 *E. coli* BL21(DE3) 中, 经 IPTG 诱导和 SDS-PAGE 分析, 可见约 31kDa 的目的蛋白以可溶性形式表达于上清中。Western blot 分析发现, 表达产物与鸡传染性贫血的阳性血清发生特异性反应。纯化蛋白免疫小鼠后制得的多抗可以与全病毒发生反应, 证明其具有免疫原性, 为进一步研究 VP2 蛋白的功能及开展 CIAV 疫苗及诊断试剂的研制奠定了基础。

关键词 : 鸡传染性贫血病毒; VP2 基因; 克隆; 表达

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2006)05-0841-03

鸡传染性贫血病毒(Chicken infectious anemia virus CIAV)属于圆环病毒科、环形病毒属(Gyrovirus)。该病毒由日本学者 Yuasa 于 1979 年首次分离, 我国于 1992 年由崔现兰等^[1]分离到该病毒。目前, 该病已经遍布世界主要养禽国家。病毒感染 2 周龄以内的雏鸡可引起死亡, 感染成年鸡引起免疫抑制, 使得鸡群对其它疾病的易感性增加, 对疫苗的反应性下降, 从而给养禽业带来巨大损失。

CIAV 基因组结构简单, 为单股、环状 DNA, 约 2.3kb, 主要编码 3 种蛋白, VP1、VP2 和 VP3。其中, VP3 为病毒的致病性蛋白, 以凋亡方式引起感染细胞的死亡, 该蛋白对病毒的复制也起着重要作用。VP1 为病毒的主要结构蛋白, 但是 Koch 等^[2]研究发现 VP1 单独在杆状病毒中表达时, 只能刺激机体产生较弱的免疫反应, 而当其与 VP2 共同表达时, 则可刺激机体产生中和抗体, 因此, VP2 在刺激机体产生中和抗体方面起着不可或缺的作用。文献^[3]报道, 在杆状病毒中表达的 VP2 蛋白在 Western blot 中与 CIAV 的抗血清反应性良好, 以该蛋白为抗原, 对鸡群进行抗体监测, 在 CIAV 感染后的 2~20 周均可以检测到 CIAV 抗体。因此, VP2 可以做为诊断抗原研制 CIAV 的抗体检测试剂盒。

迄今为止, VP2 功能研究不十分清楚, 这与难以在病毒中纯化大量 VP2 蛋白有极大关系。本研究将 VP2 基因克隆至 pET-28a 中, 构建了重组表达载体 pET-28-VP2。SDS-PAGE 显示, 目的蛋白以可溶性形式表达, Western blot 分析表明, 重组蛋白与 CIAV 的阳性抗血清反应。该蛋白免疫小鼠以后, 可以刺激机体产生抗 CIAV 的抗体。这为 VP2 功能研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、菌株和质粒 : CIAV M9905 毒株, 由本实验室保存。表达载体 pET-28a, 大肠杆菌(*Escherichia coli* DH5 α , BL21(DE3))由本实验室保存。

1.1.2 酶和试剂 : 限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I, Pyrobest DNA Polymerase, DNA Marker, T4 DNA 连接酶均购自大连 TaKaRa 公司, 核酸凝胶回收试剂盒购自上海华舜公司。HisTrapTM kit 纯化试剂盒购自 Amersham Biosciences 公司, HRP-羊抗鸡 IgG 酶标结合物购自 Sigma 公司。

1.2 引物的设计与合成

根据 GenBank 已公布的 CIAV 的 VP2 基因序列, 设计引物如下: 上游引物(2bu): 5'-GCGGATCCATGCACGGGAACGGCGAC-3', 其 5'端设计有 *Bam*H I 位点(下划线部分); 下游引物(2bl): 5'-CGGTCGACTCAGCTATACGTACCGG-3', 其 5'端设计有 *Sal* I 位点(下划线部分)。引物由大连 TaKaRa 公司合成并经过 HPLC 纯化。

1.3 病毒 DNA 的提取

病毒 DNA 的提取参照文献^[4]的方法进行。

1.4 VP2 基因的获取

以提取的病毒 DNA 为模板, 用 VP2 特异性引物进行扩增, 反应体系: ddH₂O 70 μ L, 10 \times PCR Buffer 10 μ L, dNTP Mixture 8 μ L, 上、下游引物各 4 μ L, Pyrobest DNA Polymerase 0.5 μ L, 模板 4 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 4min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 58 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min。反应结束后取 5 μ L PCR 产物用 0.8%琼

* 通讯作者。Tel: 86-451-85935078; E-mail: xmw@hvri.ac.cn

作者简介: 王晓艳(1977-), 女, 内蒙古赤峰人, 博士研究生, 主要从事动物病毒分子生物学与免疫学研究。

收稿日期: 2005-11-28; 接受日期: 2006-01-09; 修回日期: 2006-04-12

脂糖凝胶进行电泳分析。分析正确后,其余 PCR 产物用琼脂糖凝胶试剂盒回收,按说明书操作。

1.5 重组表达载体 pET-28-VP2 的构建和鉴定

将回收的 PCR 产物与载体 pET-28a 分别用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切,回收纯化,用 T4 DNA 连接酶于 16℃ 连接过夜,将连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。提取质粒,分别做 PCR 及酶切鉴定,选取阳性质粒,进一步测序确认(英俊生物技术有限公司),鉴定阳性克隆,获得重组质粒 pET-28-VP2。

1.6 目的基因在大肠杆菌中的表达

将空载体 pET-28a 和重组质粒 pET-28-VP2 分别转化大肠杆菌感受态 BL21(DE3)细胞。分别挑取单菌落到含卡那霉素(Kan)的 LB 培养液中,37℃ 摇菌过夜,活化。第二天按 1:100 接菌到 5 mL 含 30 μ g/mL Kan 的 LB 中,37℃ 摇菌到 OD_{600} 达到 0.6 左右时,加入终浓度为 1 mmol/L 的异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)诱导培养。3 h 后收集菌液,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western blot 分析,检测表达产物。

1.7 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

诱导后收集菌液,12000 r/min 离心 1 min,弃上清,用 1 mL pH7.4 的 PBS 重悬沉淀,7000 r/min 离心 8 min,用 100 μ L pH7.4 的 PBS 重悬沉淀,加入等体积的 2 \times 上样缓冲液,混匀,煮沸 10 min。进行 SDS-PAGE(5% 的浓缩胶,12% 的分离胶)分析。

目的蛋白和蛋白分子质量标准经 SDS-PAGE 后,电转移到 PVDF 膜上(操作按说明书进行)。PVDF 膜干燥后直接放入 1:50 稀释的 CIAV 阳性血清(采自经肝组织毒免疫的 SPF 鸡)中,室温下作用 1 h, PBST 洗涤 3 次后,放入 1:5000 稀释的 HRP-羊抗鸡 IgG 酶标结合物溶液中,室温下作用 45 min,同上洗涤后,用底物溶液(二氨基联苯胺)显色。

1.8 融合蛋白的亲纯化

将鉴定为阳性的重组菌按 1.6 方法大量诱导以后,离心收集菌体,超声波后弃沉淀,将上清加入 2 mol/L 咪唑至终浓度为 10 mmol/L,室温作用 1 h,然后用注射器上柱,缓慢流出后,用 5 mL 浓度为 10 mmol/L 的咪唑溶液洗涤,除去非特异性结合的杂蛋白,最后加入 5 mL 浓度为 300 mmol/L 的咪唑溶液洗涤目的蛋白,1 mL/管,分管收集目的蛋白洗脱液,用 SDS-PAGE 检测蛋白纯度,同时用 Bradford 方法对蛋白进行定量。

1.9 高免血清制备

将纯化的目的蛋白与等量弗氏完全佐剂乳化后,腹腔注射 8 周龄的 BALB/c 鼠,50 μ g/只,以后每隔两周用等量弗氏不完全佐剂乳化,加强免疫两次,剂量同首免,第 3 次免疫后 15 d 采血,分离血清。用细胞培养的 CIAV 包被 ELISA 板检测其抗体反应,同时用纯化的蛋白包被 ELISA 板检测其效价。

2 结果

2.1 目的片段的获得及重组表达载体的酶切和 PCR 鉴定

以提取的病毒 DNA 为模板,经过 PCR 扩增获得了与预期大小相符的 650 bp 左右的目的片段。将该片段克隆至 pET-28a 载体中,提取质粒后,用 2bu、2bl 引物进行 PCR 扩增

鉴定。同时以 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切鉴定。0.8% 琼脂糖凝胶电泳结果显示 PCR 产物及酶切片段的大小与预期结果一致。测序结果证实目的片段大小及阅读框均正确。

2.2 目的基因在大肠杆菌中的表达、纯化和 Western blot 检测

阳性重组质粒在大肠杆菌中被诱导后,于 3 h 取样,进行 SDS-PAGE 分析,发现重组菌在约 31 kDa 处出现目的融合蛋白,而对照菌在 31 kDa 附近未出现蛋白条带(图 1-A),表明目的蛋白获得表达。

表达产物经 SDS-PAGE 分析后,转移至 PVDF 膜上进行 Western blot 结果显示,表达产物能被 CIAV 阳性血清所识别,证明表达产物具有免疫反应性(图 1-B)。

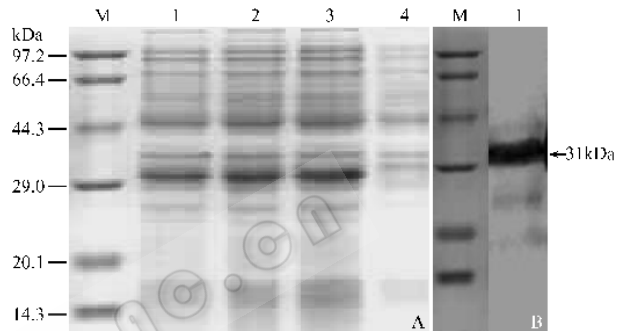


图1 重组蛋白 SDS-PAGE 分析(A)和 Western blot 检测(B)

Fig. 1 A: SDS-PAGE analysis of recombinant protein. M. Protein marker; 1 ~ 3. Induced recombinant bacteria; 4. Induced pET-28a. B: Western blot analysis of recombinant protein. 1. Recombinant protein.

2.3 高免血清的检测

纯化蛋白免疫小鼠以后,获得了鼠抗 CIAV VP2 的血清。用 CIAV 作为包被抗原,以 CIAV 标准阳性血清(同 Western blot 检测用血清)作为阳性对照,以未免疫鼠的阴性血清为阴性对照进行 ELISA 检测,当免疫后血清以 1:100 倍稀释时,与 CIAV 反应的 OD_{490} 值在 1.0 左右,而标准阴性血清 OD_{490} 值为 0.112,证明所表达的 VP2 可以刺激机体产生 CIAV 特异性的抗体。以纯化蛋白为包被抗原,检测该血清的效价达 1:12800 以上。

3 讨论

大肠杆菌表达系统操作简便,成本低廉,可以大量生产目的蛋白,当目的蛋白与标签蛋白融合后,可以方便蛋白的纯化,从而利于对蛋白结构与功能进行研究,所以目前应用广泛。本研究将 CIAV 的 VP2 蛋白以融合形式成功表达,并证实其主要以可溶形式存在,经 Western blot 检测其具有抗原活性。

CIAV 感染鸡群以后,引起免疫抑制,体内病毒抗体滴度较低,因此,检测时抗体稀释倍数不可过高。本研究在做 Western blot 检测时,当血清以 1:100 倍稀释时,目的蛋白在 PVDF 膜上未出现特异性反应,而血清以 1:50 倍稀释时,则发现目的蛋白可以与血清发生特异性反应。这就提示我们用病毒免疫无法获得高免血清的情况下,可以利用表达蛋白

制备多克隆抗体及单抗。VP2 在体外成功获得表达,经 Western blot 分析其具有良好的反应原性。表达蛋白免疫小鼠后,制得的血清可以与 CIAV 全病毒反应,这为体外获得针对 CIAV 的多克隆抗体及单克隆抗体的制备奠定了基础。

迄今为止,鸡传染性贫血病毒复制机制研究还不很透彻,但可以肯定,病毒基因组编码的 3 种蛋白对病毒复制、致病机制等均发挥着重要而又不同的作用。Peters 等^[5]在发现 CIAV 的 VP2 具有双重特异性磷酸酶活性的基础上,于 2005 年报道^[6]在 VP2 的蛋白磷酸酶基序内,第一个半胱氨酸的突变,可以导致细胞培养的病毒生长缓慢,滴度下降。本研究中获得 VP2 蛋白,为在体外对其功能进行研究及开展 CIAV 疫苗及诊断试剂的研制奠定了基础。

参 考 文 献

[1] 崔现兰,周芳红,辛桂香,等. 鸡传染性贫血病毒的鉴定. 中国畜禽传染病,1992,6:3-5.

[2] Koch G, van Roozelaar DJ, Verschuuren CAJ, et al. Immunogenic and protective properties of chicken anaemia virus proteins expressed by baculovirus. *Vaccine*, 1995, 13:763-770.

[3] Iwata N, Fujino M, Tuchiya K, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant chicken anemia virus proteins expressed in a baculovirus vector system. *Vet Med Sci*, 1998, 60(2):175-180.

[4] 王英,王笑梅,高宏雷,等. CIAV VP1 C 端基因片段克隆及其在大肠杆菌中的表达. 中国预防兽医学报,2004,26:432-435.

[5] Peters MA, Jackson DC, Crabb BS, et al. Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase. *Biol Chem*, 2002, 277(42):39566-39573.

[6] Peters MA, Jackson DC, Crabb BS, et al. Mutation of chicken anemia virus VP2 differentially affects serine/threonine and tyrosine protein phosphatase activities. *Gen Virol*, 2005, 86:623-630.

Expression of the VP2 gene of chicken infectious anemia virus in *E. coli* and analysis of immunogenicity

WANG Xiao-yan¹, WANG Xiao-mei^{1*}, GAO Yu-long¹, GAO Hong-lei¹, LU Gui-li²

(¹ Division of Avian Infectious Diseases, National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

(² Xinjiang Agricultural University, Urumchi 830052, China)

Abstract :The coding region of VP2 gene from Chicken Infectious Anemia was amplified from genome extracted from chicken liver tissue by PCR. PCR product was double digested with restriction enzymes *Bam*H I and *Sal* I and cloned into pET-28a digested with *Bam*H I and *Sal* I. Subsequently, the recombinant plasmid pET-28-VP2 was extracted and double digested with restriction enzymes *Bam*H I and *Sal* I. After confirming its rightness by PCR and analysis of restriction endonucleases, the recombinant plasmid pET-28-VP2 was transformed into *E. coli* BL21(DE3)strain. The culture was induced by 1mmol/L IPTG at 37℃ for three hours and analyzed with SDS-PAGE. The result shows that gene encoding VP2 of CIAV was expressed successfully in *E. coli* and the fusion protein existed in supernatant, which was about 31kDa and showed specific immunoreactivity with anti-CIAV sera in Western blot. The fusion protein was purified by Ni²⁺-affinity chromatography and quantitated by Bradford method. Then BALB/c mice were immunized with purified protein emulsified with Freund's complete adjuvant on day 0 and boosted twice on day 14 and 28 with the same dose of antigens emulsified with Freund's incomplete adjuvant, respectively. The serum isolated were examined by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the purified VP2 and CIAV as coating antigens and the serum could react with target protein and CIAV in ELISA detection test.

Keywords : Chicken infectious anemia virus (CIAV); VP2 gene; Expression; Immunogenicity

* Corresponding author. Tel 86-451-85935078; E-mail: xmw@hvri.ac.cn

Received: 28 November 2005/Accepted: 9 January 2006/Revised: 12 April 2006